

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# マスト細胞に発現する BASH/SLP-76 ファミリーシグナル伝達分子

後飯塚 僚

●マスト細胞に発現する高親和性IgEレセプターからのシグナル伝達に参与するBASH/SLP-76ファミリーアダプター分子であるMISTの機能について概説する。

キーワード：マスト細胞、シグナル伝達、アダプター分子

B細胞抗原レセプターやT細胞抗原レセプターなどのリガンド結合機能とシグナル伝達機能が別々のサブユニットから構成される多サブユニット型の免疫レセプターは、その構造だけでなくシグナル伝達機構も非常に類似したシステムをもっている。すなわち、シグナル伝達ユニットに存在するimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を起点として、チロシンキナーゼとホスファターゼによる細胞内のさまざまなシグナル分子の一過性のチロシンリン酸化が起こる。それを介したシグナル分子複合体の動的な形成、離散によってレセプターからのシグナルがその下流に伝達されていくものと考えられている。近年、それらシグナル分子のなかでも自分自身酵素活性をもたないアダプター・リンカーとよばれる分子の免疫レセプターシグナル伝達における重要性が明らかになってきている。とくに、B細胞特異的に発現するBASH/BLNK/SLP-65分子<sup>1-3)</sup>はT細胞抗原レセプターシグナル伝達において重要な機能をもつアダプター分子であるSLP-76分子<sup>4-6)</sup>と分子構造的に同じファミリーに属する分子であり、B細胞抗原レセプターシグナル伝達系においてSykキナーゼとPLC- $\gamma$ の活性化を結ぶ必須の

リンカー蛋白であることが判明している<sup>7)</sup>。

本稿ではマスト細胞に発現する多サブユニット型レセプターである高親和性IgEレセプター(Fc $\epsilon$ レセプター)のシグナル伝達に参与するBASH/SLP-76ファミリーに属する新規アダプター分子であるMIST (mast cell immunoreceptor signal transducer)<sup>8)</sup>の発現および機能について紹介する。

## ■MISTの単離とその発現様式

著者らは当初、マウスMIST遺伝子をニワトリBASHのSH2ドメインと有意な相同性を示す未知のcDNA断片としてESTデータベースのなかに見出した。そのcDNA断片を用いてNorthern blot法により遺伝子の発現について解析したところ、骨髄、脾、リンパ節を含むいずれの生体臓器においても本遺伝子の発現は確認できなかったが、血液系、非血液系の各種細胞株を用いた解析から、本遺伝子はT細胞、B細胞、マクロファージ、非血液系の細胞株においては発現されておらず、マスト細胞株であるP815細胞にのみ発現されていることを見出した。

そこで、さらに各種マスト細胞株における発現について解析を行ったところ、PT18細胞、RBL-2H3細胞、IL-3で誘導した骨髄由来マスト細胞においてもその発現が認められた。また、RT-PCR法によりヒトにおける相同遺伝子を単離し、ヒト血液系細胞における発現について調べた結果、マウスの場合と同様に、IL-6/stem cell factor (SCF) で培養したヒト臍帯血由来マスト細胞に発現が認められ、マスト細胞以外の血球系細胞株では発現していなかった。このようなMISTのマスト細胞特異的な発現をさらに裏づける結果として、正常マウス皮膚ならびにアトピー様皮膚病変を自然発症するNC/Ngaマウス<sup>9)</sup>の皮膚において、トルイジンブルー陽性のマスト細胞でのみ免

A BASH/SLP-76-related adaptor protein expressed in mast cells

Ryo GOTSUKA: 東京理科大学生命科学研究分子生物学研究部門、科学技術振興事業団PRESTO



図1 NC/Ngaマウスのアトピー様皮膚病変部におけるMIST蛋白の免疫組織染色像  
トルイジンブルー陽性のマスト細胞(左) 特異的にMISTの発現が認められる(右)。

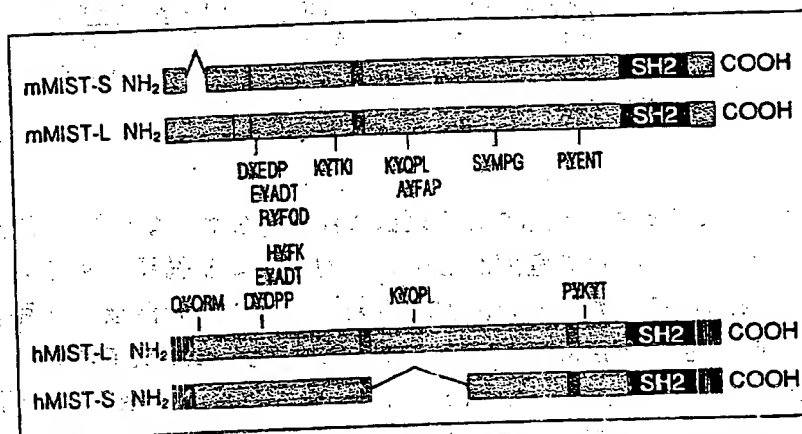


図2 マウスMIST (mMIST) とヒトMIST (hMIST) の分子構造

疫組織学的解析によりMIST蛋白の発現が確認された(図1)。これらの所見より、生体における主要なMIST発現細胞はマスト細胞であると考えられた。

### ■ MISTの分子構造

マウスMISTは435個のアミノ酸からなる分子量約60kDaの分子であり、NH<sub>2</sub>末端から中央にかけて8個のリン酸化される可能性のあるチロシン残基が認められ、COOH末端にはBASHやSLP-76のそれとアミノ酸レベルでそれぞれ41%、38%の相同性を示すSH2ドメインが存在する(図2)。また、MIST分子中央部にはプロリン残基に富む領域があり、1カ所のGrb2のSH3ドメインとの結合モチーフ(PXXPXR/K)が認められる。一方、ヒトMIST分子は6個のリン酸化される可能性のあるチロシン残基が存在し、そのうち5個がマウスMISTとの間で保存されており、また、2個のPXXPXR/Kモチーフが認められた。また、それぞれalternative splicingに起因すると考えられるshort-formのMIST mRNAが存

在し、マウスにおいてはNH<sub>2</sub>末端近傍の24アミノ酸、ヒトにおいてはプロリン残基に富む領域の37アミノ酸に対応する領域が欠失していた。マウスとヒトMIST間のホモロジーは約60%であり、BASH/SLP-76に比較し、種間での相同性が低い傾向にあったが、全体の分子構造学的類似性から、MISTはBASH/SLP-76ファミリーに属する第3番目のシグナル分子であると考えられる。

### ■ Fcεレセプターシグナル伝達系におけるMIST

つぎに、分子構造上アダプター分子としての特徴を有するMISTが果たしてFcεレセプターシグナル伝達系においてアダプター分子として機能しているかどうかについて一連の解析を行った。野生型MIST、あるいはMIST分子の6個のチロシン残基をすべてフェニルアラニンに置換した変異型MISTを発現させたRBL-2H3細胞クローンを用いて、DNP-HSAとDNP特異的IgEを用いてFcεレセプターを架橋することによるMISTのチロシンリン酸化を調べたところ、刺激前から

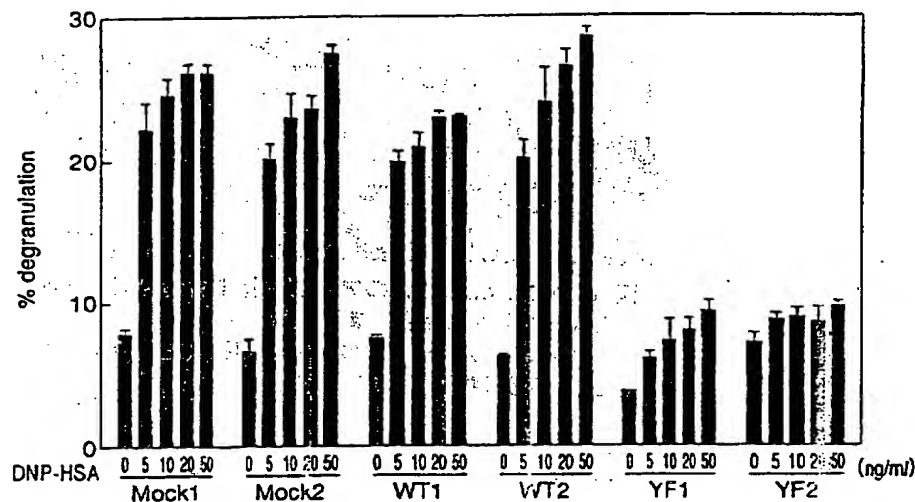


図3 野生型MIST (WT) と変異型MIST (YT) を過剰発現した RBL-2H3 細胞のFcεレセプター架橋による脱顆粒反応

MISTのリン酸化は認められたものの、刺激に伴い急速にチロシンリン酸化の程度が上昇し、約30秒でそれは最高に達した。また、刺激前後の各種シグナル分子との会合について解析した結果、MISTはPLC-γ2, Vav, LAT, Grb2と会合し、一方、変異型MISTは刺激によってもリン酸化されずGrb2との会合は検出できたが、その他のPLC-γ2, Vav, LATとの会合は認められなかった。

これらの結果から、MISTはBASH/SLP-76の場合と類似したシグナル分子と会合することが明らかになった。また、COS細胞にMISTと各種チロシンキナーゼを発現させることによりMISTのチロシンリン酸化をつかさどるキナーゼの検索を行ったところ、MISTはLynにより強くリン酸化され、SykとBtk単独ではリン酸化されないことから、MISTはSrcファミリーに属するLynの基質であることが判明した。

#### ■マスト細胞の脱顆粒反応におけるMISTの役割

そこで、野生型MISTあるいは変異型MISTを発現させたRBL-2H3細胞クローンのFcεレセプター刺激による脱顆粒反応についてβ-hexosaminidase法を用いて調べたところ、変異型MISTを発現する細胞クローンにおいてベクターのみをトランスフェクションした細胞クローンと比較し、顕著に脱顆粒が抑制されていることが明

らかになった(図3)。この変異型MISTの発現による脱顆粒反応抑制機構についてFcεレセプター刺激後の細胞内カルシウム動態ならびにNF-AT反応エレメントを有するレポーターを用いてNF-AT転写因子の活性化について解析を行った結果、変異型MISTを発現するクローンにおいてはレセプター刺激後の細胞内カルシウム濃度の上昇、ならびにNF-ATの活性化が著明に低下していた。

これらの変異型MISTによるMIST機能阻害の実験結果から、MISTはFcεレセプターシグナル伝達系において細胞内カルシウム濃度の上昇ならびにNF-ATの活性化に関与しており、結果としてマスト細胞の脱顆粒反応に深く関与するシグナル分子であることが示唆された。しかし、上述のような生化学的変化がありながら、これらの変異型MISTを発現するクローンにおいてFcεレセプター刺激後のPLC-γ2とVavのリン酸化は一見低下しておらず、LATのリン酸化のみが変異型MISTを発現するクローンにおいて著明に低下していることが判明した。

#### ■Fcεレセプターシグナル伝達系におけるMISTとSLP-76, LATの相互作用

MISTと同じアダプターファミリーに属するSLP-76ならびに細胞膜にアンカーされるアダプターであるLAT<sup>10-12)</sup>の機能に関しては、おもにT細胞レセプターシグナル伝達系において詳細に解

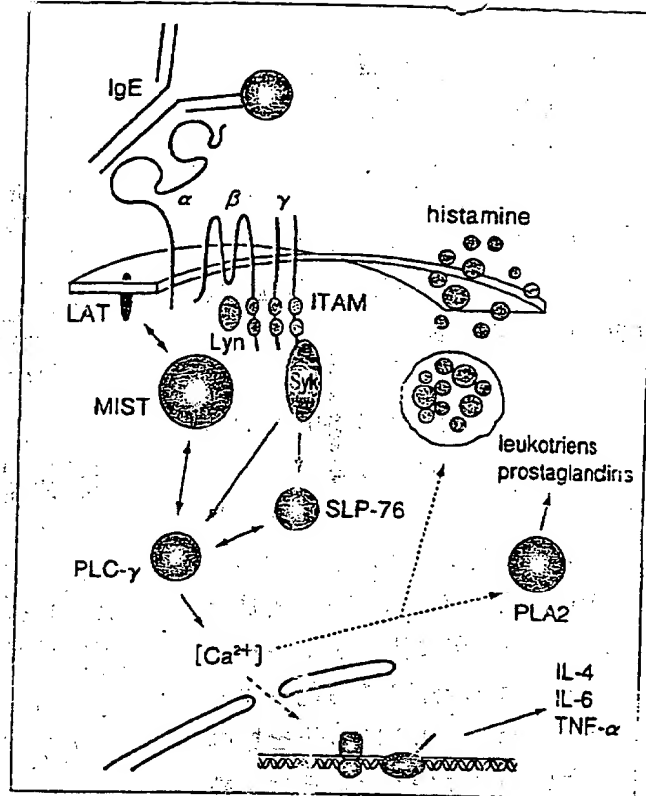


図4 Fcεレセプターシグナル伝達系におけるMISTの位置づけ

析されているが、これらの分子はT細胞だけでなくマスト細胞、血小板、およびNK細胞に発現していることが明らかになっている。最近、SLP-76およびLAT欠損マウスにおいてFcεレセプター刺激によるマスト細胞の脱顆粒反応およびサイトカインの産生が著明に低下していることが報告されている<sup>13,14</sup>。これらの知見と著者らのMISTに関するデータを総合して考えると、あくまでもFcεレセプターシグナル伝達系に限っていえば、MISTとSLP-76の機能は一部重複するものの、いくつかの点で異なったシグナル伝達過程に関与しているものと思われる(図4)。つまりMISTはLynによってリン酸化され、LATの上流に位置し、SykによるLATのリン酸化の制御に関与しているが、SLP-76はSykによってリン酸化され、T細胞レセプターシグナル伝達の解析から推定するとLATの下流に位置すると考えられる。Fcεレセプター刺激からマスト細胞の脱顆粒に至る一連のシグナル伝達系におけるMIST、SLP-76、LATを含むこれらアダプター分子の相互作用を今後より詳細に解析することによって、脱顆粒反応に必

要なシグナルの実体が明らかになる可能性があると思われる。

#### ■サイトカインによるMISTの発現制御

著者らがマスト細胞に発現するシグナル分子として解析してきたマウスMISTと同一分子が、別のグループからサイトカインで培養された細胞株に発現するシグナル分子(cytokine-dependent hemopoietic linker: Clnk)として報告された<sup>15</sup>。著者らもIL-3依存性増殖を示すマスト細胞株であるMC9細胞においてIL-3 starvationの後、IL-3あるいはIL-4を添加することによりMIST mRNA発現の上昇が認められ、一方、SCFの添加では上昇が認められないという結果を得ている。

このような炎症性サイトカインによるMISTの発現の増強は、アレルギーや炎症局所においてサイトカインシグナルと免疫レセプターシグナルのcross-talkが生じている可能性を示唆している。すなわち、抗原刺激によりT細胞やマスト細胞上の免疫レセプターから伝達されたシグナルによって炎症性サイトカインの産生が誘導され、それら

のサイトカインがつぎにマスト細胞上のサイトカインレセプターを介してMISTの発現を増強するシグナルを伝達する。その結果、MISTを介したFcεレセプターシグナル伝達系の反応亢進状態が生じるというような、2つのシグナル系のpositive feedbackによってアレルギー反応の増強が起こっている可能性が考えられる。

#### ■おわりに

MISTは生体においておもにマスト細胞に発現され、その発現がサイトカインによって調節され、さらにFcεレセプターを介したマスト細胞の脱顆粒反応に関与していると考えられるシグナル分子である。今後、炎症反応やアレルギー反応局所におけるMISTの発現や脱顆粒に至るFcεレセプターシグナル伝達系におけるMISTの機能をより詳細に解明することによって、MIST分子を標的とした抗アレルギー剤の開発といったあらたな創薬への道が開かれるものと思われる。

#### 文献

- 1) Fu, C. et al. : *Immunity*, 9 : 93-103, 1998.
- 2) Goitsuka, R. et al. : *J. Immunol.*, 161 : 5804-5808, 1998.
- 3) Wienands, J. et al. : *J. Exp. Med.*, 188 : 791-795, 1998.
- 4) Jackman, J. K. et al. : *J. Biol. Chem.*, 270 : 7029-7032, 1995.
- 5) Clements, J. L. et al. : *Science*, 281 : 416-419, 1998.
- 6) Pivniouk, V. et al. : *Cell*, 94 : 229-238, 1998.
- 7) Ishiai, M. et al. : *Immunity*, 10 : 117-125, 1999.
- 8) Goitsuka, R. et al. : *Int. Immunol.* (in press)
- 9) Matsuda, H. et al. : *Int. Immunol.*, 9 : 491-466, 1997.
- 10) Finco, T. S. et al. : *Immunity*, 9 : 617-626, 1998.
- 11) Zhang, W. et al. : *Cell*, 92 : 83-92, 1998.
- 12) Zhang, W. et al. : *Int. Immunol.*, 11 : 943-950, 1999.
- 13) Zhang, W. et al. : *Immunity*, 10 : 323-332, 1999.
- 14) Pivniouk, V. I. et al. : *J. Clin. Invest.*, 103 : 1737-1743, 1999.
- 15) Cao, M. Y. et al. : *J. Exp. Med.*, 190 : 1527-1534, 1999.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**